

Suco de uva suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose

Grape juice supplemented with *Lactobacillus acidophilus* and oligofrutose

Joice Sifuentes dos Santos¹; Ana Augusta Odorissi Xavier²;
Priscila Boneventi³; Roberta B. de Souza⁴; Sandra Garcia^{5*}

Resumo

Alimentos simbióticos contendo probióticos e prebióticos são benéficos para a saúde humana. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um suco de uva simbiótico, como alternativa a bebidas lácteas probióticas, contendo o probiótico *Lactobacillus acidophilus* e o prebiótico oligofrutose. Para avaliar a melhor formulação do suco, foi realizado um planejamento fatorial 2². O suco comercial pasteurizado foi inoculado com 10 e 15% de oligofrutose e 10⁷ e 10⁸ UFC/mL de *L. acidophilus*, mantido sob refrigeração por 8 dias. O pH dos sucos elaborados (2,86 – 3,52) aumentou em relação ao controle (2,69). Observou-se que a formulação contendo 10% de oligofrutose e 10⁸ UFC/mL de *L. acidophilus* foi a que apresentou contagem de bactérias lácticas (1,25 x 10⁷ UFC/mL) dentro da legislação para utilização da alegação de produto probiótico. Assim, esta formulação foi escolhida para realizar a análise sensorial. O teste triangular demonstrou que houve diferença significativa entre o suco simbiótico e o suco controle (p≤0,001). Por outro lado, no teste afetivo de preferência (escala hedônica de 9 pontos), as notas atribuídas pelos 18 provadores ao suco controle (6,67±1,27) e ao simbiótico (5,56±2,56) não diferiram estatisticamente (p>0,05).

Palavras-chave:

Abstract

Synbiotic foods containing probiotics and prebiotics are good for human health. The aim of this work was to develop a symbiotic grape juice, as alternative to dairy probiotic products, containing the probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* and oligofrutose as prebiotic. To evaluate the best juice formulation, was realized a 2² factorial planning. The juice was kept under refrigeration for 8 days. The symbiotic juice pH (2.86-3.52) increased in comparison to the control (2.69). It was observed that the formulation containing 10% oligofrutose and 10⁸ CFU/mL of *L. acidophilus* presented the lactic acid bacterial counting (1.25 x 10⁷ CFU/mL) according to the legislation for probiotic claim. This formulation was

¹ Farmacêutica e Bioquímica – Tecnóloga de Alimentos, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Bolsista CNPq do Brasil.

² Farmacêutica e Bioquímica – Tecnóloga de Alimentos, Mestre em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Bolsista CNPq do Brasil.

³ Bióloga, Mestre em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Bolsista CAPES.

⁴ Bióloga, Mestre em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Bolsista CNPq do Brasil.

⁵ Engenheira de Alimentos, Doutora em Ciência de Alimentos, Professora do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. Telefone: (43) 3371-4565.

* Autor para correspondência

selected for sensorial evaluation. The triangular test showed a significant difference between synbiotic and control juice ($p \leq 0.001$). In the other hand, in the affective test of preference (hedonic scale of 9 points), the scores given by the 18 panelists to the control (6.67 ± 1.27) and synbiotic (5.56 ± 2.56) juices were not statistically different ($p > 0.05$).

Key words:

Introdução

Probióticos são definidos como suplementos microbianos que influenciam positivamente o organismo e aumentam de maneira significativa o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, através do equilíbrio microbiano intestinal e das funções fisiológicas do trato intestinal humano. Da mesma forma, alimentos probióticos são definidos como alimentos contendo microrganismos, que possuem efeito benéfico sobre a microbiota intestinal e as funções fisiológicas do trato intestinal humano. Na sua grande maioria, os produtos probióticos do mercado são de origem láctea, e a disponibilidade de produtos não lácteos ainda é reduzida.

Dentre os diversos gêneros que integram este grupo, destacam-se *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, em particular, a espécie *Lactobacillus acidophilus*. Além dos benefícios em termos de nutrição e de saúde que proporcionam, as culturas probióticas podem também contribuir para melhorar o sabor do produto final, possuindo a vantagem de promover acidificação reduzida durante a armazenagem pós-processamento (GOMES; MALCATA, 1999). As culturas utilizadas como probióticas devem tolerar o processamento e manter a viabilidade celular durante o armazenamento. A sobrevivência das células no produto irá depender de diversos fatores, como pH e presença de preservantes (CHARTERIS et al., 1998).

Os frutooligosacarídeos (FOS) consistem de moléculas de sacarose, nas quais uma ou duas outras unidades de frutose são adicionadas por ligações β -1,2 à molécula de frutose original. O grau de polimerização varia de 2 a 10 unidades. Os derivados são encontrados naturalmente em vegetais e plantas como alcachofra, raiz de chicória, dália, dente de leão, alho, cebola, banana e outras. No entanto, a quantidade encontrada nesses alimentos

é pequena, exigindo consumo elevado para se obter o efeito funcional esperado. A oligofrutose (inulina hidrolisada enzimaticamente) é considerada um prebiótico. Prebiótico é um ingrediente alimentar que não é hidrolisado por enzimas digestivas humanas no trato gastrointestinal superior e afeta benéficamente o indivíduo, por estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade de bactérias no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Alimentos probióticos são definidos como aqueles que contêm culturas de microrganismos que afetam benéficamente a saúde do consumidor por melhorar seu balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). Quando prebióticos e probióticos estão presentes simultaneamente, o termo utilizado é simbiótico (JAIN et al., 2004).

Entre as propriedades prebióticas estudadas, existe um consenso de que os FOS modificam o habitat intestinal, causando aumento no bolo fecal, normalização da frequência fecal, efeito prebiótico (aumenta o número de bactérias e/ou atividade do número de bifidobactérias e bactérias lácticas, no intestino humano), estímulo da absorção de cálcio dos alimentos, modulação do metabolismo lipídico e prevenção de casos de câncer (GERMAN et al., 1999; RAO, 2001).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em suco de uva com adição de oligofrutose e verificar sua aceitação sensorial.

Materiais e Métodos

Materiais

Foi utilizado suco de uva pasteurizado, não fermentado, não alcoólico, reconstituído, sem conservantes, com validade de 1 ano. Cada 200 mL

do suco (segundo o fabricante) era composto por 30 g de carboidratos e 0,3 mg de ferro. O produto não continha proteína, gordura ou sódio, e teor não significativo de cálcio.

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-5 da empresa Christian Hansen, liofilizada e de uso direto, foi dissolvida asépticamente em suco de uva. O suco, após inoculação e homogeneização, foi armazenado por um período de 8 dias sob refrigeração a 8 °C. Ao mesmo tempo em que a cultura foi adicionada ao suco, também foi realizada uma contagem de bactérias lácticas para avaliação.

A oligofrutose utilizada foi da marca Orafiti, comercializada sob o nome Raftilose®.

Métodos

Foram realizadas análises de pH e contagem de *Lactobacillus acidophilus* no tempo zero (logo após adição de *L. acidophilus* e oligofrutose) e 2, 4 e 8 dias após a adição. As análises de pH e contagens foram feitas em duplicata.

O pH das amostras foi determinado utilizando pHmetro Tecnal.

Para avaliar o crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, foram adicionados 10 mL de suco a 90 mL de água peptonada. A seguir, procedeu-se a diluições em série e inoculou-se 1 mL em placas de Petri estéreis, adicionando em seguida 15-20 mL de meio MRS (ágar de Man, Rogosa & Sharpe). As placas foram incubadas a 37 °C por 36 h.

A contagem de microrganismos indicadores (coliformes a 35 °C) foi realizada através do método do NMP (número mais provável). O consumo das amostras não apresentou risco de contaminação de

origem fecal aos provadores, uma vez que havia ausência deste tipo de microrganismos. Foram adicionados 10 mL de suco (10^{-1}) a 90 mL de água peptonada e procedeu-se mais 2 diluições (10^{-2} e 10^{-3}). Foi inoculado 1 mL de cada diluição em tubo contendo caldo VB (verde brilhante) e tubo de Durhan invertido. Os tubos foram incubados a 35 °C/ 24 – 48 horas.

A possível interação entre o teor de oligofrutose e a contagem de BAL no tempo zero (variáveis independentes) sobre o crescimento de BAL ao término de 8 dias de incubação (variável dependente) foi avaliada através da técnica de superfície de resposta. Para isso, foi utilizado um planejamento experimental fatorial 2^2 . Os níveis encontram-se na Tabela 1. Para verificar se o tratamento realizado promoveu diferença no sabor do suco adicionado de sistemasimbótico,procederam-seanálises sensoriais no produto utilizando um painel composto por 18 provadores não-treinados recrutados dentre alunos, professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina. Foram realizados os testes triangular, onde se apresenta ao provador três amostras, sendo duas iguais entre si e uma diferente, e verifica-se a capacidade do provador de reconhecer qual amostra é a diferente, e o teste afetivo de preferência mediante escala hedônica de 9 pontos (1 – desgostei muitíssimo; 9 – gostei muitíssimo). Os testes foram praticados em cabines individuais do laboratório de análise sensorial, durante o período vespertino, com a luz vermelha acesa para mascarar a aparência das amostras, requisitando-se aos provadores o enxágüe da boca com água potável a temperatura ambiente, antes de provar a amostra. Cada amostra foi fornecida em copos descartáveis brancos contendo 30 mL de suco, e foram apresentadas aos provadores em ordem aleatória.

Tabela 1. Planejamento experimental contendo as variáveis e os níveis usados nos experimentos.

Amostra	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	Oligofrutose (g/100 mL)
Controle	0	0
1	10 ⁷	10
2	10 ⁷	15
3	10 ⁸	10
4	10 ⁸	15

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 6.0, submetendo-se os resultados à análise de variância (ANOVA).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos a partir de análises microbiológicas e de pH dos sucos de uva adicionado de *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose, ao longo de 8 dias de incubação, podem ser observados nas Figuras 1 e 2.

Todas as amostras apresentaram o mesmo comportamento de pH durante o experimento. O valor de pH permaneceu constante até o 4º dia de incubação, sofrendo pequena diminuição nos dias posteriores (Figura 1). Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Martínez-Villaluenga et al. (2006), que analisaram a influência da adição de oligossacarídeos na sobrevivência de probióticos em leite fermentado refrigerado.

A amostra controle (sem adição de *L. acidophilus* e oligofrutose) não continha bactérias lácticas naturalmente presentes (Figura 2). Nas amostras 1 e 2, onde foi adicionado 10⁷ UFC/mL de *L. acidophilus*, não houve sobrevivência das bactérias lácticas até o fim dos 8 dias de incubação, tanto com adição de 10 ou 15% de oligofrutose. Pode-se observar que a maior sobrevivência de microrganismos ocorreu na amostra 3, onde

adicionou-se 10⁸ UFC de *L. acidophilus* /mL e 10% de oligofrutose, sendo esta a formulação escolhida para realizar a análise sensorial. Esta formulação atingiu o valor estabelecido pela legislação para contagem de bactérias probióticas, que é de 10⁷ UFC/mL (BRASIL, 2000). As contagens realizadas evidenciaram que na amostra 3 houve manutenção do número de microrganismos até o oitavo dia, o mesmo não ocorreu com a amostra 4, onde foi inoculada a mesma quantidade de microrganismos, porém quantidade superior de oligofrutose.

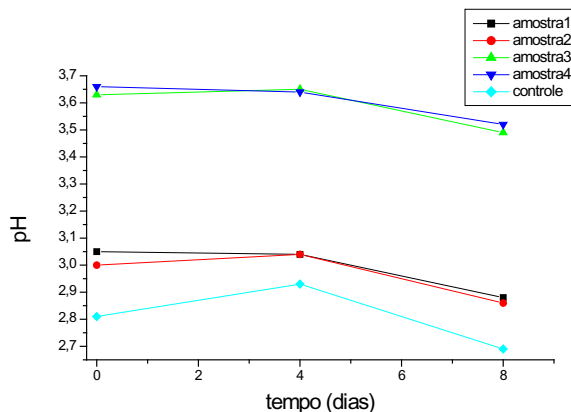


Figura 1. Valores de pH das amostras de suco de uva simbiótico ao longo de 8 dias de incubação. Amostra 1= 10⁷ UFC/mL de *L. acidophilus* (La-5) e 10% de oligofrutose; amostra 2= 10⁷ UFC/mL de La-5 e 15% de oligofrutose; amostra 3= 10⁸ UFC/mL de La-5 e 10% de oligofrutose; amostra 4= 10⁸ UFC/mL de La-5 e 15% de oligofrutose; controle= suco sem adição de La-5 e oligofrutose.

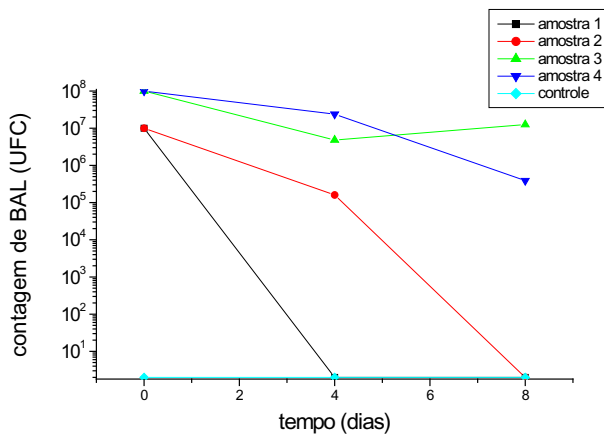


Figura 2. Contagem de bactérias lácticas (BAL) em suco de uva simbiótico ao longo de 8 dias de incubação. Amostra 1= 10⁷ UFC/mL de *L. acidophilus* (La-5) e 10% de oligofrutose; amostra 2= 10⁷ UFC/mL de La-5 e 15% de oligofrutose; amostra 3= 10⁸ UFC/mL de La-5 e 10% de oligofrutose; amostra 4= 10⁸ UFC/mL de La-5 e 15% de oligofrutose; controle= suco sem adição de La-5 e oligofrutose.

Na Figura 3 observa-se a superfície de resposta do crescimento de bactérias lácticas sob a influência da quantidade de oligofrutose e concentração inicial de bactérias lácticas. Não houve interação entre as variáveis quantidade de oligofrutose e concentração inicial de inóculo, não exercendo efeito sobre a contagem de BAL. A concentração inicial de inóculo influenciou a contagem de BAL, embora em pequena proporção.

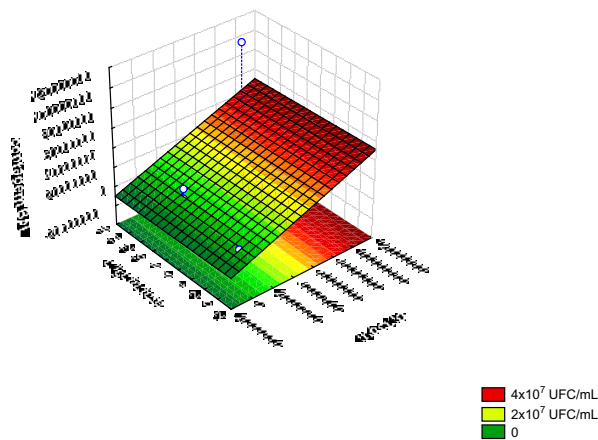


Figura 3. Superfície de resposta do crescimento de bactérias lácticas (BAL) em UFC/mL, utilizando 2 fatores (% de oligofrutose e contagem de BAL no tempo zero) em 2 níveis.

Quanto ao crescimento de coliformes a 35 °C, observou-se ausência em todas as amostras.

A avaliação sensorial, através do teste triangular, demonstrou que houve diferença significativa entre o suco adicionado de sistema simbiótico e o suco controle, com $p \leq 0,001$. Apenas 2 provadores não detectaram diferença entre as amostras. Por outro lado, no teste afetivo de preferência, as notas atribuídas pelos 18 provadores ao suco controle e ao simbiótico não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). As notas atribuídas aos sucos são apresentadas na Figura 4. O suco controle obteve nota média $6,67 \pm 1,27$ e o suco simbiótico $5,56 \pm 2,56$, utilizando uma escala hedônica de 9 pontos. Para notas abaixo de 5 considera-se o produto rejeitado, nota igual a 5 indiferença, e notas superiores a 5 significam aceitação do produto. Pode-se observar que o suco controle foi rejeitado por apenas 1 pessoa, enquanto que o suco simbiótico por 7 pessoas. Nenhum dos provadores demonstrou indiferença em relação a ambos. O suco simbiótico recebeu uma nota máxima. Diversos provadores relataram gosto mais adocicado do suco adicionado de sistema simbiótico, o que pode estar relacionado ao gosto levemente doce apresentado pela oligofrutose. Para solucionar este problema, poder-se-ia reduzir ou, se necessário, retirar da formulação o edulcorante utilizado, aproveitando o poder adoçante da oligofrutose.

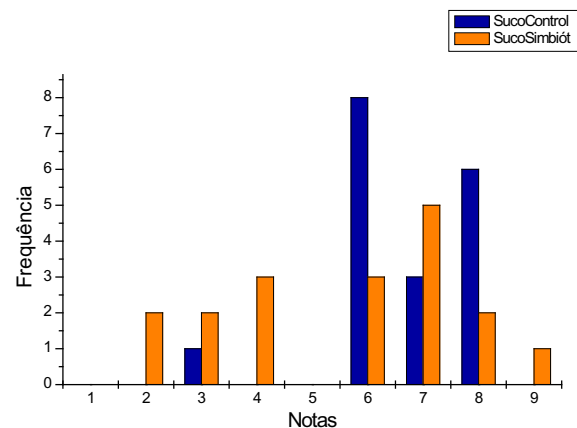


Figura 4. Frequência das notas atribuídas aos sucos controle e simbiótico através da Análise Sensorial por Teste Afetivo (18 provadores). Foi utilizada escala hedônica de 9 pontos: 1 – desgostei muitíssimo; 9 – gostei muitíssimo. Nota < 5 = produto rejeitado, nota 5 = indiferença, nota > 5 = produto aceito. Não houve diferença estatística nas notas atribuídas ao suco simbiótico e ao comercial.

Para o desenvolvimento de um suco simbiótico é importante que este possua o nível de probióticos recomendado pela legislação, e também apresente boas características sensoriais. Estas características desempenham um papel importante na aceitação dos consumidores. Assim, para trabalhos futuros são indicados novos testes para verificar qual seria o período em que os microrganismos permaneceriam viáveis na formulação desenvolvida.

A AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2006) considera *Lactobacillus acidophilus* um microrganismo probiótico. Para comercialização de um produto com alegação de probiótico, no rótulo do mesmo deve constar a seguinte frase: “(indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Além disso, deve-se também declarar, próximo à alegação, a quantidade do probiótico em unidades formadoras de colônias (UFC) contidas na porção diária do produto pronto para consumo. A empresa fabricante deve apresentar laudo de análise do produto para comprovar a quantidade do microrganismo viável até o final do prazo de validade do produto.

Conclusão

O suco de uva simbiótico desenvolvido pela adição de 10^8 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* e 10% de oligofrutose, incubado a 8 °C por 8 dias, apresentou a contagem mínima necessária para um produto ser considerado probiótico.

Os provadores, através do teste triangular, diferenciaram o suco controle do suco simbiótico. Entretanto, no teste afetivo não houve diferença entre as notas atribuídas pelos provadores ao suco controle e ao simbiótico.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. *Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos*. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 maio 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Resolução nº05, de 13 de novembro de 2000. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, p. 2000.
- CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*, Huntingdon, v. 51, n. 4, p. 123–136, 1998.
- FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.
- GERMAN, B.; SCHIFFRIN, E. J.; RENIERO, R.; MOLLET, B.; PFEIFER, A.; NEESER, J. R. The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 17, n. 12, p. 492-499, 1999.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.
- GOMES, A. M. P., MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Boletim de Biotecnologia de Alimentos*, São Paulo, n. 64, p. 12-22, 1999.
- JAIN, P. K.; MCNAUGHT, C. E.; ANDERSON, A. D. G.; MACFIE, J.; MITCHELL, C. J. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofrutose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clinical Nutrition*, Kidlington, v. 23, n. 4, p. 467–475, 2004.
- MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GÓMEZ, R.; VIDAL-VALVERDE, C. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, Barking, v. 16, n. 7, p. 768–774, 2006.
- RAO, V. A. The prebiotic properties of oligofrutose at low intake levels. *Nutrition Research*, Tarrytown, v. 21, n. 6, p. 843–848, 2001.